

# 早发冠心病患者高密度脂蛋白抗 HUVEC 凋亡的作用机制

侯曜曜<sup>1</sup>, 尔璐<sup>1</sup>, 张永亮<sup>1</sup>, 宋晓苏<sup>2</sup>, 白瑞<sup>2</sup>, 梁斌<sup>2</sup>, 边云飞<sup>2</sup>, 肖传实<sup>3</sup>

(1.山西医科大学, 2.山西医科大学第二医院心内科 心血管疾病诊治及临床药理山西省重点实验室,

3.山西医科大学第一医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 早发冠心病; 高密度脂蛋白; 氧化型低密度脂蛋白; 细胞凋亡; 动脉粥样硬化

[摘要] **目的** 通过细胞实验探究早发冠心病(PCHD)患者高密度脂蛋白(HDL<sub>PCHD</sub>)与健康人群 HDL(HDL<sub>health</sub>)抗人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡作用是否有区别及其可能机制。**方法** 采集 PCHD 患者和与之相匹配的健康人血样,并提取 HDL;不同浓度氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)处理 HUVEC 24 h,MTT 检测细胞存活率,明确 ox-LDL 引起 HUVEC 凋亡的合适浓度;不同浓度、不同时间的 HDL<sub>health</sub> 预处理 HUVEC 后,再用合适浓度的 ox-LDL 处理 HUVEC 24 h,MTT 检测细胞存活率,明确 HDL<sub>health</sub> 预处理 HUVEC 的最适浓度与最适作用时间;用最适浓度 HDL<sub>health</sub>、HDL<sub>PCHD</sub> 对 HUVEC 进行最适作用时间的预处理,再用合适浓度的 ox-LDL 处理 HUVEC 24 h,MTT 检测细胞存活率。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒进行流式细胞检测,Western blot 检测 Caspase 3、Caspase 9 的蛋白表达,用试剂盒测定活性氧(ROS)活性,使用 Lipoprint 脂蛋白分析仪分析 HDL<sub>health</sub> 和 HDL<sub>PCHD</sub> 亚组分(HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>10</sub>)分布情况。**结果** 100 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 24 h 后细胞存活率为 60.34%,较空白处理组明显降低( $P<0.05$ );200 mg/L HDL<sub>health</sub> 预处理 HUVEC 18 h 后,细胞存活率为 82.01%,可以明显减弱 ox-LDL 对细胞的损伤;200 mg/L HDL<sub>health</sub> 显著抑制 100 mg/L ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡及 Caspase 3、Caspase 9 的蛋白表达和 ROS 产生;200 mg/L HDL<sub>PCHD</sub> 预处理 HUVEC 18 h 后,细胞存活率为 65.5%,其作用较 HDL<sub>health</sub> 减弱;200 mg/L HDL<sub>PCHD</sub> 可抑制 100 mg/L ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡及 Caspase 3、Caspase 9 的蛋白表达和 ROS 产生,但作用较 HDL<sub>health</sub> 减弱;HDL<sub>PCHD</sub> 亚组分大颗粒(HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>)含量较 HDL<sub>health</sub> 低( $28.5\% \pm 5.7\%$  比  $46.8\% \pm 15.2\%$ ),而小颗粒(HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>)含量较 HDL<sub>health</sub> 高( $21.4\% \pm 7.8\%$  比  $10.9\% \pm 5.4\%$ )。**结论** HDL<sub>PCHD</sub> 与 HDL<sub>health</sub> 比较,可能由于其亚组分大颗粒(HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>)含量较 HDL<sub>health</sub> 低,而小颗粒(HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>)含量较 HDL<sub>health</sub> 高,导致其抗氧化功能减弱,抑制 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡的功能亦减弱,从而减弱或丧失抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Mechanism of high density lipoprotein against HUVEC apoptosis in patients with premature coronary heart disease

HOU Yao-Yao<sup>1</sup>, ER Lu<sup>1</sup>, ZHANG Yong-Liang<sup>1</sup>, SONG Xiao-Su<sup>2</sup>, BAI Rui<sup>2</sup>, LIANG Bin<sup>2</sup>, BIAN Yun-Fei<sup>2</sup>, XIAO Chuan-Shi<sup>3</sup>

(1.Shanxi Medical University, 2.Department of Cardiology, the Second Hospital of Shanxi Medical University & Key Laboratory of Cardiovascular Disease Diagnosis, Treatment and Clinical Pharmacology of Shanxi Province, 3.Department of Cardiology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Premature coronary heart disease; High density lipoprotein; Oxidized low density lipoprotein; Apoptosis; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether there is a difference between HDL<sub>PCHD</sub> and HDL<sub>health</sub> against human umbilical vein endothelial cells apoptosis in patients with premature coronary heart disease (PCHD) and the possible mechanism. **Methods** Blood samples of PCHD patients and healthy subjects were collected, and HDL was isolated from the blood samples. Human umbilical vein endothelial cells were treated for 24 hours with different concentrations of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), cell viability was detected by MTT, to identify the appropriate concentration of ox-LDL

[收稿日期] 2016-11-28

[修回日期] 2017-02-23

[作者简介] 侯曜曜,硕士研究生,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 985090433@qq.com。通讯作者肖传实,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床、心力衰竭及心律失常的诊断和治疗,E-mail 为 ganxi-baozhongxin@sina.com。

induced human umbilical vein endothelial cells cell apoptosis. Human umbilical vein endothelial cells were pretreated with different hours and different concentration of HDL<sub>health</sub>, then treated with the appropriate concentration of ox-LDL for 24 hours, cell viability was detected by MTT, to identify the optimal concentration and time of HDL<sub>health</sub> pretreated human umbilical vein endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells were pretreated with the optimal hours and the optimal concentration of HDL<sub>health</sub> and HDL<sub>PCHD</sub>, then treated with the appropriate concentration of ox-LDL for 24 hours, cell viability was detected by MTT. Annexin V-FITC/PI apoptosis detection kit was used for flow cytometry staining, Western blot was used to detect Caspase 3 and Caspase 9 protein expression, kit was used to detect the activity of reactive oxygen species (ROS), sub-fraction (HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>10</sub>) distribution of HDL<sub>health</sub> and HDL<sub>PCHD</sub> were analyzed by Lipoprint System.

**Results** Human umbilical vein endothelial cell survival rate was 60.34% after treatment with 100 mg/L ox-LDL for 24 hours, which was significantly lower than that in the blank treatment group ( $P<0.05$ ). Human umbilical vein endothelial cell survival rate was 82.01% after pretreated with 200 mg/L HDL<sub>health</sub> for 18 hours, which could significantly reduce the damage of ox-LDL to cells. 200 mg/L HDL<sub>health</sub> could significantly inhibit apoptosis of human umbilical vein endothelial cells, the expression of Caspase 3 and Caspase 9 and the production of ROS, which were induced by 100 mg/L ox-LDL. Human umbilical vein endothelial cell survival rate was 65.5% after pretreated with 200 mg/L HDL<sub>PCHD</sub> for 18 hours, and its effect was weaker than that of HDL<sub>health</sub>. 200 mg/L HDL<sub>PCHD</sub> could inhibit apoptosis of human umbilical vein endothelial cells, the expression of Caspase 3 and Caspase 9 and the production of ROS induced by 100 mg/L ox-LDL, but the effect was weaker than that of HDL<sub>health</sub>. The content of large particle (HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>) in HDL<sub>PCHD</sub> subgroup was lower than that in HDL<sub>health</sub> ( $28.5\%\pm 5.7\%$  vs.  $46.8\%\pm 15.2\%$ ), while the content of small particle (HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>) was higher than that of HDL<sub>health</sub> ( $21.4\%\pm 7.8\%$  vs.  $10.9\%\pm 5.4\%$ ). **Conclusion** Comparison to the HDL<sub>health</sub>, perhaps due to the large particle of HDL<sub>PCHD</sub> sub-fraction content (HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>) was lower than that of HDL<sub>health</sub>, while the small particle was higher than that of HDL<sub>health</sub> (HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>), resulting in antioxidant function weakened, inhibiting the apoptosis of endothelial cells induced by ox-LDL were decreased, thereby weakening or losing the role of anti-atherosclerosis.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是多种心血管疾病的病理基础<sup>[1]</sup>, 内皮损伤是 As 形成的起始环节<sup>[2-3]</sup>, 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 是内皮细胞损伤的重要因素, 因此, 抗 As 的一个重要方面是防止或逆转 ox-LDL 引起的内皮损伤。大量的临床和基础研究表明高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 与 As 呈负相关<sup>[4]</sup>。HDL 除具有胆固醇逆转运作用外, 还有调节血管舒张、抗氧化抗炎作用, 从而保护血管内皮, 对抗 As 形成。

早发冠心病 (premature coronary heart disease, PCHD) 是冠心病的一种特殊类型, 指发病年龄男性  $\leq 55$  岁, 女性  $\leq 65$  岁的冠心病患者。近年来 PCHD 发病率有所增加, 其特点为冠状动脉病变发生早或者病程发展迅速。环境与遗传等多种因素在冠心病的发生发展中起重要作用, 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平下降是其独立的危险因素, 无论低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 水平如何, HDLC 均与冠心病发病率呈负相关<sup>[4]</sup>, 换言之, HDL 对冠心病有保护作用。但有研究证实冠心病患者 HDL 与健康人 HDL (HDL<sub>health</sub>) 作用相反, 不但不能有效保护内皮功能, 反而表现出促进内皮功

能紊乱的作用<sup>[5-6]</sup>。如 HDL<sub>health</sub> 具有抑制 NO 释放, 抑制 VCAM-1 等炎性因子表达、抑制白细胞黏附血管壁等作用, 但冠心病患者体内的 HDL 上述功能减弱, 可进一步使血管壁发生炎性病变<sup>[7]</sup>。另外, 冠心病患者 HDL 不能有效激活 Bcl-xL, 反而通过活化 p38-MAPK 信号通路激活促凋亡因子 Bid, 使内皮细胞促凋亡途径活化, 失去对内皮细胞的保护作用<sup>[8]</sup>。冠心病患者 HDL 之所以表现出促进内皮功能紊乱的作用是由于其结构变化导致功能发生改变。既往研究也显示 PCHD 患者 HDL (HDL<sub>PCHD</sub>) 的组成较 HDL<sub>health</sub> 有所改变<sup>[9]</sup>。由此推测, HDL<sub>PCHD</sub> 的组成发生改变是否导致其功能如胆固醇逆转运、抗氧化、抗炎作用减弱或丧失? 是否引起或加速 As 的进程? 本研究对此进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 购自上海拜力生物科技有限公司; 人 ox-LDL、免疫印迹化学发光试剂 (ECL) 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; Caspase 3 抗体、Caspase 9 抗体购自北京易科拜德科技有限公司; 活性氧 (reactive oxygen

species, ROS) 试剂盒、HDL 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; MTT 检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞检测试剂盒购自上海贝博生物; 羊抗鼠 IgG FITC 购自康为世纪生物科技有限公司; 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 其余试剂均为国产分析纯产品。

## 1.2 血样采集、HDL 的分离与提取

采集健康人血样(男性 $\leq 55$ 岁, 女性 $\leq 65$ 岁)和 PCHD 患者血样[入选条件: ①男性 $\leq 55$ 岁, 女性 $\leq 65$ 岁; ②确诊冠心病者(既往心肌梗死或冠状动脉造影显示至少一支冠状动脉血管狭窄 $>50\%$ 的典型心绞痛患者, 常规体格检查和实验室检查显示肝肾功能正常并且血脂适当, 所有受试者均需签署知情同意书。排除条件: ①糖尿病或血清甘油三酯 $\geq 400$  g/L; ②严重的控制不良的高血压; ③任何可能干扰本实验的伴随疾病或精神异常; ④任何提示受试者不配合本实验的情况; ⑤不签署知情同意书者]。采用超高速离心机提取 HDL, HDL 鉴定、脱盐、冷冻干燥、测定浓度, 并保存待用。

## 1.3 细胞培养

HUVEC 用含 10%FBS、1%青-链霉素的高糖 DMEM 培养基在 5%CO<sub>2</sub>、37℃、饱和湿度的培养箱中静置培养, 每 2 天换液 1 次。当细胞铺满培养瓶底 80%~90%后用含 EDTA 的 0.25%胰酶消化, 2~3 天传代一次。

## 1.4 MTT 法测定细胞存活率

培养 HUVEC, 细胞计数后, 将 HUVEC 接种于 96 孔板中, 每孔  $5 \times 10^3$  个细胞, 培养 24 h 后细胞贴壁。分组处理方式见 1.4.1~1.4.4。药物处理 24 h 后每孔加入 20  $\mu$ L MTT 溶液(5 g/L), 培养箱继续孵育 4 h 后, 小心吸去培养液终止培养。每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 10 min, 充分溶解结晶甲瓚。在酶标仪 570 nm 波长下测定吸光度 OD 值, 计算细胞存活率。每组设 3 个平行组。

1.4.1 ox-LDL 对 HUVEC 存活率的影响 ox-LDL 浓度分别为 0 mg/L(空白处理组)、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 和 200 mg/L, 培养 24 h。

1.4.2 不同浓度的 HDL<sub>health</sub> 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 存活率的影响 细胞分别用浓度为 0 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 和 200 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液预处理 18 h, 再换为 100 mg/L ox-LDL 培养液处理 24 h; 空白处理组细胞用 0 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液预处理 18 h, 再换为 0 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h。

1.4.3 不同时间下的 HDL<sub>health</sub> 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 存活率的影响 细胞用 200 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液分别预处理 0 h、6 h、12 h、18 h、24 h, 再换为 100 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h; 空白处理组细胞用 0 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液预处理 18 h, 再换为 0 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h。

1.4.4 HDL<sub>health</sub>、HDL<sub>PCHD</sub> 对 ox-LDL 处理的 HUVEC 存活率的影响 空白处理组: 用 0 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液处理 18 h, 再换为 0 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h; 单独 ox-LDL 组: 用 0 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液处理 18 h, 再用 100 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h; HDL<sub>health</sub> 预处理组: 用 200 mg/L 的 HDL<sub>health</sub> 培养液处理 18 h, 再换为 100 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h; HDL<sub>PCHD</sub> 预处理组: 用 200 mg/L 的 HDL<sub>PCHD</sub> 培养液处理 18 h, 再换为 100 mg/L 的 ox-LDL 培养液处理 24 h。

## 1.5 细胞凋亡检测

使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。按 1.4.4 加药处理细胞, 分别用胰酶消化、离心后, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L PI 染料, 在室温下暗处孵育 30 min, 使用流式细胞分析仪进行分析。

## 1.6 Western blot 检测 Caspase 3 和 Caspase 9 的蛋白表达

细胞培养后, 接种于 6 孔板中, 按 1.4.4 加药处理细胞, 消化离心后, 分别收集各组细胞, 用 PBS 洗 3 次, 加入含有 PMSF 的培养细胞总蛋白提取试剂提取总蛋白, 利用 BCA 蛋白定量法进行蛋白定量。取 40  $\mu$ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后进行半干电转, 使目的蛋白转于硝酸纤维素膜上, 用 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 随后加入 Caspase 3 抗体、Caspase 9 抗体、 $\beta$ -actin 抗体, 4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加 ECL 发光液于膜上, 利用凝胶成像仪显现目的蛋白条带, 保存图像并记录灰度值, 与相应内参  $\beta$ -actin 做比较, 得出各组目的蛋白的相对表达量。

## 1.7 ROS 检测

细胞培养后, 接种于 6 孔板中, 按 1.4.4 加药处理细胞后, 除去上层培养液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 每孔加入含  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 荧光探针 DCFH-DA 的培养基, 于 37℃孵育 20 min 后, 再用 PBS 清洗细胞 3 次, 充分洗去未进入细胞内的 DCFH-DA, 收集细胞, 用 PBS 调整细胞浓度。使用 490 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 荧光酶标仪检测荧光的强弱。

1.8 HDL<sub>health</sub>和 HDL<sub>PCHD</sub>颗粒大小及亚组分分布

将采集到的血样以 3000 r/min 离心 10 min 分离血清,按说明书配制电泳液,将 25 μL 相应血清加入含有凝胶的试管中,再加入 200 μL 浓缩胶与血清混匀,试管放在照射灯下照射 30 min 后插入电泳槽的空隙内,倒入电泳缓冲液电泳。电泳完后取下试管静置 30 min,试管依次放在扫描仪上扫描,经 Lipoprint 脂蛋白分析仪分析 HDL<sub>health</sub>和 HDL<sub>PCHD</sub>颗粒大小及亚组分(HDL<sub>I</sub>-HDL<sub>10</sub>)分布的图像及结果。

1.9 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,定量资料进行正态性检验,符合正态分布的数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。定性资料以百分比或绝对值表示,采用用  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组人群的主要特征比较

与健康对照者比较,PCHD 患者体质指数、总胆固醇水平较高,而 HDLC、LDLC 水平较低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ;表 1)。

2.2 HDL 的鉴定

从入选研究对象(健康对照者 10 例,PCHD 患者 10 例,共 20 例)的血浆样品中提取 HDL 样品,用比浊法鉴定超速离心分离的 HDL 纯度。样本中载脂蛋白 A I 被检出,载脂蛋白 B 未检出(载脂蛋白 B 是 LDL、VLDL 主要载脂蛋白成分),说明本研究使用超速离心法分离受 LDL、VLDL 的污染少。由于 HDL 中主要的成分是载脂蛋白 A I,电泳显示在载脂蛋白 A I (约 25 kDa) 的区域内有蛋白的明显富集;与血浆样品比较,HDL 样品泳道内白蛋白(72 kDa 附近)位置的成分被大量去除(图 1)。

2.3 HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 存活率的影响

与空白处理组比较,单独 ox-LDL 处理 HUVEC 后细胞存活率均有下降,且随浓度的增加细胞存活率降低,存在一定的浓度依赖性。用 HDL<sub>health</sub> 预处理 HUVEC 后,细胞存活率显著升高,存在一定的浓度和时间依赖性,200 mg/L HDL<sub>health</sub> 预处理 HUVEC 18 h 后,可明显减弱 ox-LDL 对细胞的损伤。与 HDL<sub>health</sub> 预处理可明显减弱 ox-LDL 对细胞的损伤相比,HDL<sub>PCHD</sub> 预处理对其抑制作用减弱(图 2)。

2.4 HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡的影响

与空白处理组相比,100 mg/L ox-LDL 可显著诱

导细胞凋亡,细胞凋亡率达到 23.10%,HDL<sub>health</sub> 预处理可显著降低 ox-LDL 诱导的细胞凋亡,而 HDL<sub>PCHD</sub> 预处理对 ox-LDL 诱导的细胞凋亡的抑制作用较 HDL<sub>health</sub> 预处理弱(图 3)。

表 1. 研究人群的主要特征

Table 1. Characteristics of the study population			
项 目	健康对照组 ( <i>n</i> = 10)	早发冠心病组 ( <i>n</i> = 10)	<i>P</i> 值
年龄(岁)	50.3±2.2	51.7±1.9	0.146
男/女(例)	7/3	7/3	NS
收缩压(mmHg)	115.0±8.7	123.6±13.5	0.107
舒张压(mmHg)	74.50±6.92	74.20±10.24	0.94
平均动脉压(mmHg)	88.00±3.59	90.67±10.54	0.46
体质指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.41±1.27	27.03±3.85	0.01
空腹血糖(mmol/L)	4.97±0.59	5.07±0.71	0.75
HbA1c(%)	4.85±0.41	5.03±0.61	0.46
总胆固醇(mmol/L)	4.71±0.53	3.85±0.76	0.009
HDLC(mmol/L)	1.49±0.16	1.06±0.31	0.001
LDLC(mmol/L)	3.32±0.40	2.15±0.51	<0.001
TG(mmol/L)	2.16±0.66	2.61±0.95	0.23
肌酐(μmol/L)	65.7±16.35	68.2±15.86	0.733
服用药物[例(%)]			
他汀类	0	100	
β受体阻滞剂	0	90	
利尿剂	0	10	
ACEI/ARB	0	30	
钙离子通道阻滞剂	0	1	
阿司匹林肠溶片	0	100	
氯吡格雷	0	90	

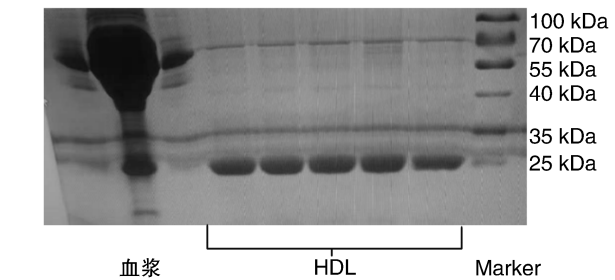


图 1. HDL 和血浆的 SDS-PAGE 电泳  
Figure 1. SDS-PAGE electrophoresis of HDL and plasma

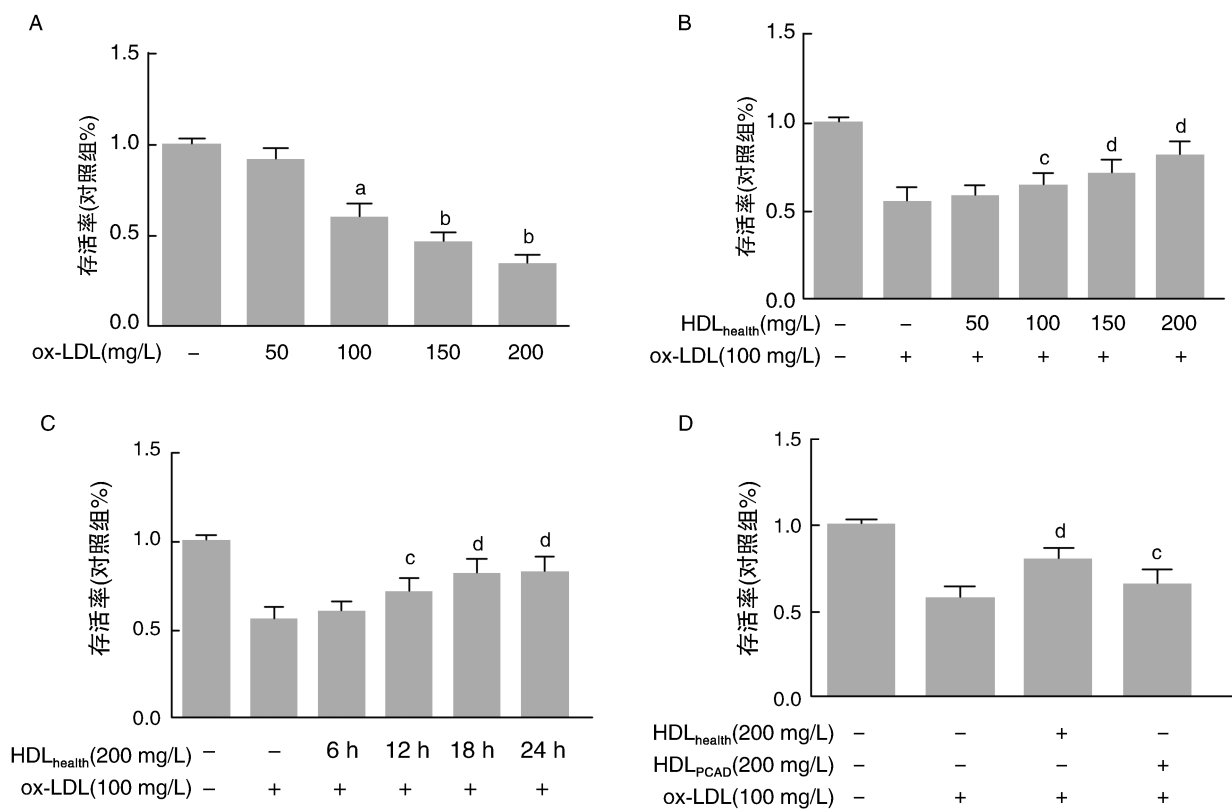


图 2. HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 存活率的影响 A 为单独 ox-LDL 处理 24 h 对 HUVEC 存活率的影响,B 为不同浓度 HDL<sub>health</sub> 预处理 18 h 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 存活率的影响,C 为 200 mg/L HDL<sub>health</sub> 预处理不同时间对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 存活率的影响,D 为 HDL<sub>PCHD</sub> 预处理对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 存活率的影响。a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与空白处理组比较;c 为  $P<0.05$ ,d 为  $P<0.01$ ,与单独 ox-LDL 处理组比较。

Figure 2. Effect of HDL on the survival rate of HUVEC induced by ox-LDL

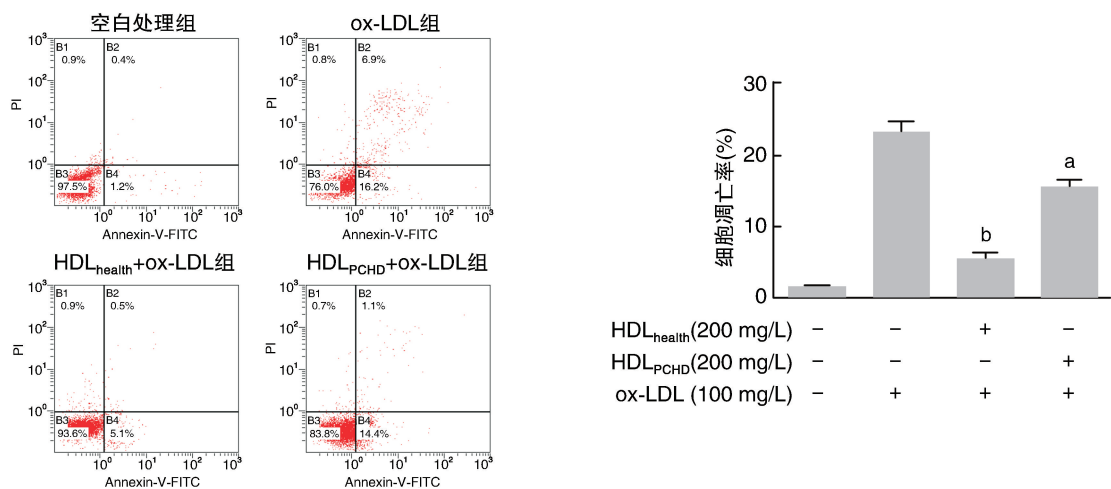


图 3. HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡的影响 a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与单独 ox-LDL 处理组比较。

Figure 3. Effects of HDL on ox-LDL induced apoptosis in HUVEC

2.5 HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡相关蛋白的影响

与空白处理组相比, ox-LDL 可明显上调 Caspase 3、Caspase 9 蛋白的表达, HDL<sub>health</sub> 预处理明

显抑制 ox-LDL 诱导的 Caspase 3、Caspase 9 蛋白的表达, 而 HDL<sub>PCHD</sub> 预处理对 ox-LDL 诱导的 Caspase 3、Caspase 9 蛋白的表达的抑制作用减弱 (图 4)。

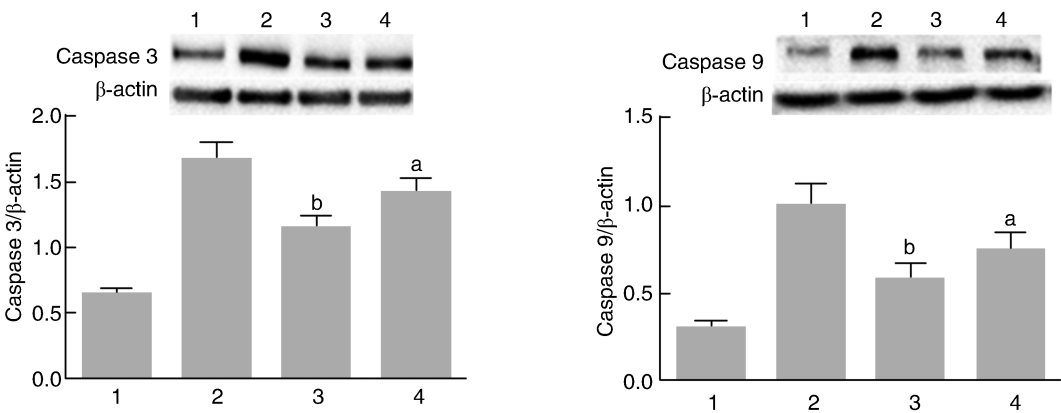


图 4. HDL 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 凋亡途径相关蛋白的影响 1 为空白处理组,2 为单独 ox-LDL 处理组,3 为 HDL<sub>health</sub> + ox-LDL 组,4 为 HDL<sub>pCHD</sub> + ox-LDL 组。a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与单独 ox-LDL 处理组比较。

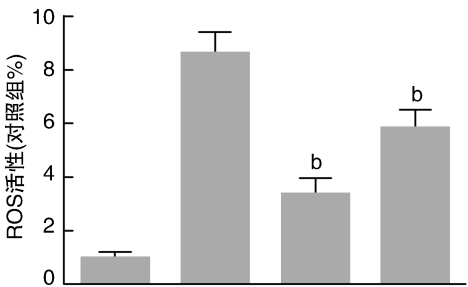
Figure 4. Effect of HDL on protein changes in HUVEC apoptosis pathway induced by ox-LDL

2.6 HDL 对 ox-LDL 诱导的 ROS 生成的影响

与空白处理组相比,ox-LDL 可以显著升高 ROS 水平,HDL<sub>health</sub> 预处理明显抑制 ox-LDL 诱导的 ROS 水平升高,而 HDL<sub>pCHD</sub> 预处理对 ox-LDL 诱导的 ROS 水平升高的抑制作用减弱(图 5)。

2.7 HDL<sub>health</sub> 和 HDL<sub>pCHD</sub> 亚组分的分布

HDL<sub>health</sub> 组和 HDL<sub>pCHD</sub> 组所有人群血清均经 Lipoprint 脂蛋白分析仪检测,其中各选取 1 例 HDL 亚组分的图谱(图 6)。HDL<sub>pCHD</sub> 组与 HDL<sub>health</sub> 组相比,前者大颗粒 HDL 占总 HDL 百分比较低,小颗粒 HDL 占总 HDL 百分比较高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ;表 2)。



HDL <sub>health</sub> (200 mg/L)	-	-	+	-
HDL <sub>pCHD</sub> (200 mg/L)	-	-	-	+
ox-LDL (100 mg/L)	-	+	+	+

图 5. HDL 对 ox-LDL 诱导的活性氧生成的影响 a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与单独 ox-LDL 处理组比较。

Figure 5. Effect of HDL on the formation of ROS induced by ox-LDL

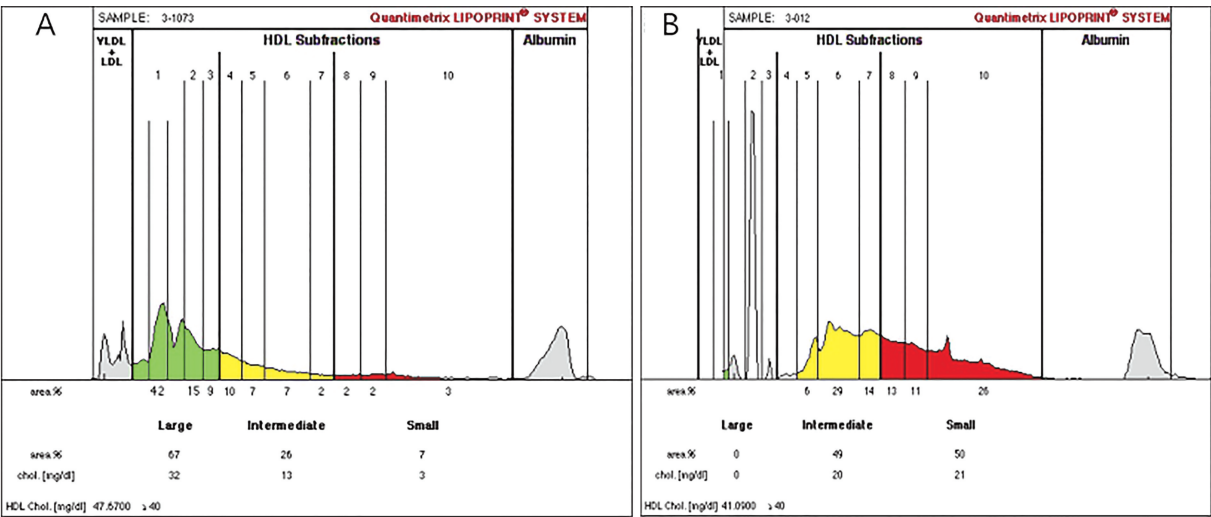


图 6. Lipoprint 脂蛋白分析仪分析 1 例 HDL<sub>health</sub>(图 6A)与 HDL<sub>pCHD</sub>(图 6B)亚组分

Figure 6. The HDL<sub>health</sub>(Figure 6A) and HDL<sub>pCHD</sub>(Figure 6B) sub-fraction map were analyzed by Lipoprint

表 2. HDL<sub>health</sub> 和 HDL<sub>PCHD</sub> 亚组分特点比较 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 2. The comparison of HDL<sub>health</sub> and HDL<sub>PCHD</sub> sub-fraction characteristics ( $\bar{x}\pm s$ )

项 目	HDL <sub>health</sub> (n = 10)	HDL <sub>PCHD</sub> (n = 10)	P 值
大颗粒 HDL/总 HDL 颗粒 (%)	46.8±15.2	28.5±5.7	0.002
中颗粒 HDL/总 HDL 颗粒 (%)	42.1±13.4	50.1±5.3	0.095
小颗粒 HDL/总 HDL 颗粒 (%)	10.9±5.4	21.4±7.8	0.002

3 讨 论

血管内皮细胞被覆于全身血管壁的最内层,可抵御各种应激因子刺激,发挥多种生理功能,是心血管系统的“保护墙”。内皮细胞的这些生理功能都是建立在其增殖与凋亡动态平衡之上,一旦平衡被打破,内皮细胞受损,引起各种应激因子的连锁反应<sup>[10-11]</sup>,拉开多种心血管疾病的“序幕”。多项研究证实,内皮细胞功能障碍是 As 发生发展的第一步<sup>[2-3]</sup>,而 As 又是多种心血管疾病共同的病理基础<sup>[1]</sup>。因此,保护内皮细胞是预防 As 和心血管疾病发生发展的重要途径<sup>[12]</sup>。

各种内外因素都可导致内皮细胞功能障碍以致凋亡。然而近年来的研究表明,ox-LDL 才是内皮细胞凋亡的“元凶”,也是最重要的致 As 因子<sup>[13]</sup>。首先,ox-LDL 对内皮细胞有损伤作用,可显著改变内皮细胞的通透性;其次,ox-LDL 可能通过某些膜受体介导多条信号通路诱导内皮细胞凋亡<sup>[14]</sup>,从而打破内皮细胞“增殖与凋亡”的动态平衡。

既往研究报道,ox-LDL 通过选择性作用于细胞周期的 S 期诱导内皮细胞凋亡<sup>[15]</sup>,且致内皮细胞凋亡的作用具有剂量依赖性和时间依赖性<sup>[16-17]</sup>。因此,本实验选取 ox-LDL 建立促内皮细胞凋亡模型。本实验通过 HUVEC 在含有不同浓度 ox-LDL 的培养基中孵育,证实 ox-LDL 的确有促进内皮细胞凋亡作用。随着 ox-LDL 浓度增加,内皮细胞活力逐渐下降,表明内皮细胞受损或凋亡,ox-LDL 浓度在 100 mg/L 对内皮细胞有较明显的损伤作用而又适宜于后续实验的进行。因而,本实验选取 100 mg/L 的 ox-LDL 建立促内皮细胞凋亡模型。

ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡的机制及其信号传导途径目前较受关注的是 Caspase 蛋白酶家族。有研究发现,Caspase 3 酶活性在 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡的过程中增高,且其抑制剂能抑制 ox-LDL 引起的内皮细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>。本研究发现 ox-LDL 可以

增加内皮细胞 ROS 水平,提示 ox-LDL 可能通过氧化损伤诱导血管内皮细胞凋亡。因此,通过干预氧化损伤环节有可能拮抗 ox-LDL 的凋亡诱导作用。

本研究中,ox-LDL 组细胞凋亡率明显高于 HDL<sub>health</sub> 预处理组,提示,HDL<sub>health</sub> 预处理可以保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡。与 ox-LDL 组比较,HDL<sub>health</sub> 预处理明显降低内皮细胞内 ROS 水平,提示 HDL<sub>health</sub> 预处理可能通过降低细胞内 ROS 水平起到抑制或减弱氧化应激引起的细胞凋亡。与 HDL<sub>health</sub> 相比,HDL<sub>PCHD</sub> 预处理对 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡的保护作用减弱,内皮细胞内 ROS 降低幅度较少。以上提示,HDL<sub>PCHD</sub> 的功能可能发生改变,导致其抗氧化作用减弱,从而减弱 ox-LDL 抑制内皮细胞凋亡的作用,引起或加重 As。

既往研究表明,HDL<sub>health</sub> 抑制内皮细胞凋亡的能力具有潜在的、重要的抗 As 作用<sup>[8]</sup>。HDL<sub>health</sub> 抑制 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡作用可能与其降低 Caspase 3 酶活性有关<sup>[18]</sup>。本研究也表明 HDL<sub>health</sub> 能降低 Caspase 3、Caspase 9 活性,抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡;而 HDL<sub>PCHD</sub> 抑制 Caspase 3、Caspase 9 活性作用减弱,抑制 ox-LDL 诱导内皮细胞凋亡作用减弱。

为了进一步探讨 HDL<sub>health</sub> 和 HDL<sub>PCHD</sub> 抗内皮细胞凋亡差异的原因,采用 Lipoprint 脂蛋白分析仪对 HDL<sub>health</sub> 组和 HDL<sub>PCHD</sub> 组血清中 HDL 亚型进行分析。结果表明 HDL<sub>PCHD</sub> 组中大颗粒 HDL 亚型 (HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>) 所占比例较 HDL<sub>health</sub> 组低,小颗粒 HDL 亚型 (HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>) 所占比例较 HDL<sub>health</sub> 组高。

综上所述,体外实验中,HDL<sub>health</sub> 可能通过减少 ROS 产生,降低 Caspase 3、Caspase 9 活性,抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡,从而起到抗 As 的作用。HDL<sub>PCHD</sub> 与 HDL<sub>health</sub> 相比,可能由于其亚组分大颗粒 (HDL<sub>1</sub>-HDL<sub>3</sub>) 含量较 HDL<sub>health</sub> 低,而小颗粒 (HDL<sub>8</sub>-HDL<sub>10</sub>) 含量较 HDL<sub>health</sub> 高,导致抗氧化功能减弱,使 ROS 产生增多,引起 Caspase 3、Caspase 9 活性升高,抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡减弱,从而减弱或丧失抗 As 的作用。

然而本研究也有局限之处,首先未能阐明 HDL<sub>PCHD</sub> 与 HDL<sub>health</sub> 在结构方面的差别,以及这种差别中的哪种或哪几种成分对 HUVEC 的凋亡产生抑制作用;其次,HDL<sub>PCHD</sub> 与 HDL<sub>health</sub> 是通过何种方式与何种细胞膜受体结合,它们的结合是否有区别;再次,HDL<sub>PCHD</sub> 与 HDL<sub>health</sub> 是否通过相同通路对 HUVEC 凋亡产生影响。另外,本实验入组人群较少。

希望后续研究能扩大样本量和解决上述局限之处。

#### [参考文献]

- [1] 王玉凡, 宋晓苏, 白瑞, 等. NgBR 对巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇逆转运的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(9): 893-898.
- [2] 吴琳, 刘勇, 熊肇军, 等. 通心络胶囊对同型半胱氨酸诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(5): 385-389.
- [3] 侯小龙. 二氢杨梅素保护内皮细胞、抑制炎症反应的抗动脉粥样硬化作用及机制研究[D]. 华中科技大学: 华中科技大学, 2015: 3.
- [4] Ahmadzadeh A, Azizi F. Genes associated with low serum high-density lipoprotein cholesterol [J]. Arch Iran Med, 2014, 17(6): 444-450.
- [5] 赵莉莉, 毛用敏. 高密度脂蛋白: 影响血管内皮功能的双刃剑[J]. 天津医药, 2015, 43(4): 439-442.
- [6] Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease [J]. Cardiovasc Res, 2014, 103(3): 350-361.
- [7] Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease [J]. J Clin Invest, 2011, 121(7): 2 693-708.
- [8] Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, et al. Altered activation of endothelial anti and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling [J]. Circulation, 2013, 127(8): 891-904.
- [9] 陈国良. 早发冠心病患者高密度脂蛋白(HDL)蛋白质组学研究[D]. 中国协和医科大学: 中国协和医科大学, 2010: 5-6.
- [10] Marti CN, Gheorghiadu M, Kalogeropoulos AP, et al. Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(16): 1 455-469.
- [11] Pierart C, Serrano V. The role of endothelial lipase in atherogenesis [J]. Rev Med Chil, 2012, 140(3): 373-378.
- [12] Chang HC, Chen TG, Tai YT, et al. Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked LOX-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(3): 842-854.
- [13] Huang YQ, Cai AP, Chen JY, et al. The relationship of plasma miR-29a and oxidized low density lipoprotein with atherosclerosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(6): 1 521-528.
- [14] Vohra RS, Murphy JE, Walker JH, et al. Atherosclerosis and the Lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor [J]. Trends Cardiovasc Med, 2006, 16(2): 60-64.
- [15] 祁红, 胡丽君. 氢气对氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(17): 1 851-853.
- [16] Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, et al. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cell by common and unique mechanisms [J]. J Bio Chem, 1998, 273(16): 9 681-696.
- [17] Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: A mechanistic clue to the "response to injury" hypothesis [J]. Circulation, 1997, 95(7): 1 760-763.
- [18] 张庆, 曾智, 任敏, 等. 高密度脂蛋白对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞凋亡的影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(1): 67-69.

(此文编辑 文玉珊)